

# Экспериментальное исследование фармакокинетики рифабутина в липосомальной форме

*Карлина М.В.<sup>1</sup>, Косман В.М.<sup>1</sup>, Пожарицкая О.Н.<sup>1</sup>, Шиков А.Н.<sup>1</sup>,  
Макарова М.Н.<sup>1</sup>, Макаров В.Г.<sup>1</sup>, Балабаньян В.Ю.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> — ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> — ООО «Технология лекарств», Московская область, г. Химки

## Резюме

На беспородных крысах-самцах изучена фармакокинетика препарата рифабутин в липосомальной форме, относительная биодоступность и распределение в тканях после эндотрахеального введения препарата, проведена оценка линейности фармакокинетики.

Для определения рифабутин в плазме крови и органах был разработан и валидирован метод ВЭЖХ с УФ-детекцией.

В ходе проведенного исследования установлена линейность фармакокинетики новой липосомальной формы рифабутин в диапазоне доз 6.5-26 мг/кг, рассчитаны основные фармакокинетические параметры, установлено, что рифабутин интенсивно распределяется в сильно васкуляризованные органы, содержание его в слабо васкуляризованных органах значительно ниже. После введения препарата наибольшая концентрация действующего вещества наблюдается в месте введения, а именно в легких.

Относительная биодоступность препарата Рифабутин в липосомальной форме в проведенном эксперименте составила 522%.

**Ключевые слова:** рифабутин, липосомы, фармакокинетика, биодоступность, ВЭЖХ, валидация.

## Experimental study of the pharmacokinetics of rifabutin in liposomal form

Carlin M.V.<sup>1</sup>, Cosman V.M.<sup>1</sup>, Pozharitskaya O.N.<sup>1</sup>, Shikov A.N.<sup>1</sup>, Makarova M.N.<sup>1</sup>, Makarov V.G.<sup>1</sup>, Balabanyan V.Y.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — JSC «Saint-Petersburg Institute of Pharmacy», St. Petersburg

<sup>2</sup> — LLC «Technology of medicines», Moscow region, Khimki

## Summary

On mongrel male rats studied pharmacokinetics of rifabutin in liposomal form, the relative bioavailability and tissue distribution after intratracheal administration, evaluated pharmacokinetic linearity. To determine rifabutin in plasma and organs were developed and validated HPLC method with UV detection. In the course of the study established a new linear pharmacokinetics of liposomal form of rifabutin dose range 6.5-26 mg/kg, calculate the main pharmacokinetic parameters found that rifabutin intensively distributed in highly vascularized organs, its content in poorly vascularized organs is much lower. After injection the highest concentration of active substance is observed at the injection site, namely the lungs. Relative bioavailability of rifabutin in liposomal form in this experiment was 522%.

**Keywords:** rifabutin, liposomes, pharmacokinetics, bioavailability, HPLC validation

## Введение

Рифабутин — противотуберкулезное антибактериальное средство широкого спектра действия, обладающее низкой растворимостью, что существенно ограничивает его применение. Терапия рифабутином часто оказывается малоэффективной в случае, если возбудители инфекционных заболеваний паразитируют внутри клеток хозяина. Способность липосом обеспечивать доставку лекарственных препаратов внутрь клетки делает их перспективными носителями для создания систем доставки рифабутин [1, 2]. Липосомы облегчают проникновение лекарственных препаратов внутрь клетки, что важно в случае лечения туберкулеза, так как возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* является

факультативным внутриклеточным паразитом, основная часть микобактерий находится в фагосоме макрофагов, что осложняет лечение заболевания. Кроме того, липосомы существенно увеличивают биодоступность лекарственных веществ при различных путях введения, не вызывают аллергических, пирогенных, иммунологических реакций [3]. Данные по изучению эффективности липосомальных антибиотиков показали возможность замены инъекционных форм пероральными. При этом возможно снижение дозы в два и более раз без потери терапевтической эффективности [4].

В ООО «Технология лекарств» разработана новая система доставки рифабутин в виде лиофилизированного липосомального порошка для эндотрахеального введения.

Целью настоящей работы явилось исследование фармакокинетики липосомальной формы рифабутина на животных после эндотрахеального введения, изучение распределения в тканях рифабутина, а также оценка относительной биодоступности новой лекарственной формы рифабутина в сравнении с субстанцией.

### Экспериментальная часть

В исследовании использовали аутбредных белых крыс-самцов массой 220–250 г (Питомник лабораторных животных РАМН «Рапполово»), которые содержались в стандартных условиях вивария со световым режимом 12 часов света и 12 часов темноты на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009), согласованном с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» и одобрены на заседании биоэтической комиссии СПб института фармации.

Исследуемый препарат — Рифабутин в липосомальной форме (ООО «Технология лекарств», Россия) вводили в трех дозах 6,5, 13 и 26 мг/кг однократно эндотрахеально с помощью аэрозоллера для мелких лабораторных животных (Penn-Century Inc., USA). Субстанцию рифабутина (Sichuan Med-Shine Pharmaceutical Co., Китай) вводили в дозе 13 мг/кг однократно эндотрахеально.

Пробы крови и органы (легкие, печень, сальник) отбирали после эвтаназии животных с помощью CO<sub>2</sub>-камеры через 0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 10,0, 24,0, 48 ч. Количество животных на одну временную точку — 5. Образцы крови помещали в гепаринизированные пробирки, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин для получения плазмы. Образцы плазмы и органов были заморожены и хранились до анализа при температуре -20°C.

Подготовка плазмы крови к анализу: в пробирку вместимостью 1,5 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,2 мл плазмы, прибавляли 0,1 мл элюента, перемешивали, прибавляли 0,4 мл смеси дихлорметана и изооктана в соотношении 2:3 и экстрагировали аналит. Далее пробы центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут, органический слой отделяли. Экстракцию смесью дихлорметана и изооктана повторяли еще раз, органические слои объединяли, растворитель удаляли, сухой остаток растворяли в 0,2 мл метанола, пробу переносили в вials для автосамплера и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Подготовка органов к анализу: размороженный орган гомогенизировали в измельчителе тканей с элюентом в соотношении 1:2. 0,4 мл полученного гомогената переносили в пластиковую пробирку вместимостью 5 мл с закрывающейся крышкой, прибавляли 2 мл

смеси дихлорметана и изооктана, вортиксировали 10 с и затем встряхивали 10 мин для экстракции аналита. Далее пробы центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут, органический слой отделяли. Процедуру экстракции повторяли еще раз. Объединенные извлечения помещали в пластиковые центрифужные пробирки вместимостью 5 мл, растворитель удаляли, сухой остаток растворяли в 0,2 мл метанола и переносили в вials для автосамплера и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Образцы анализировали на хроматографе высокого давления фирмы Shimadzu (Япония) с колонкой Luna C<sub>18</sub> (2) (4,6x150 мм, 5 μm) и предколонкой (3,0 мм) заполненной тем же сорбентом (Phenomenex, США) в изократическом режиме элюирования смесью буферного раствора с pH~4,0 (раствор, содержащий 3,8 г/л аммония уксуснокислого, доведенного ледяной уксусной кислотой до pH 4,0±0,2) и ацетонитрила в соотношении 50:50, скорость подачи элюента 1,0 мл/мин, объем пробы 20 мкл, длина волны детектирования 275 нм. Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolution (Shimadzu, Япония).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. В таблицах приведены средние арифметические значения ( $\bar{x}$ ), соответствующие им стандартные ошибки среднего значения ( $S_{\bar{x}}$ ). Параметры фармакокинетики рассчитаны методом статистических моментов [5].

### Результаты и обсуждение

Для анализа биологических проб плазмы разработали методику количественного определения рифабутина, которая была валидирована в соответствии с современными требованиями [6-9]. Методика была адаптирована для анализа проб органов и ревалидирована на примере проб печени. Основные валидационные параметры методик приведены в табл. 1.

Таблица 1

Валидационные параметры методик определения рифабутина в плазме крови и печени

Параметр	Значение в плазме	Значение в печени
Линейность (Linearity) и аналитическая область (Range), мкг/мл	0,01—50,0	0,06—46,0
Уравнение регрессии*	$Y=37368 \cdot X+300$	$Y=36742 \cdot X-483$
Коэффициент корреляции r	0,9993	0,9998
Относительное стандартное отклонение, RSD, %	0,7	0,7
Степень экстракции (Recovery), %	89,7	83,8
Точность (Accuracy), %	1,0-6,6	0,6-14,1
Прецизионность (Precision), %	0,6-8,5	0,3-6,2
Предел обнаружения (LOD), мкг/мл	0,003	0,02
Предел количественного определения (LOQ), мкг/мл	0,010	0,06

Примечания: \*у — площадь пика рифабутина;

х — концентрация рифабутина, мкг/мл

Разработанные и валидированные методики определения содержания рифабутина были использованы для анализа проб плазмы крови и органов, полученных от лабораторных животных.

Для оценки фармакокинетики липосомальной формы рифабутина и ее линейности препарат был введен в трех дозах — 6,5, 13 и 26 мг/кг, параллельно для изучения относительной биодоступности была введена субстанция рифабутина в дозе 13 мг/кг. Полученные результаты приведены на рис. 1.

После введения субстанции и липосомальной формы рифабутина фармакокинетическая кривая имеет схожую форму (рис. 1). Максимальная концентрация в плазме крови достигается достаточно быстро — через 30 минут после введения. Далее наблюдается постепенное снижение концентрации рифабутина и к 48 часу эксперимента действующее вещество в плазме крови определяется в незначительных количествах. Концентрации рифабутина, определяемые в плазме крови статистически значимо выше после введения липосомальной формы.

Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные методом статистических моментов, приведены в табл. 2

Основной параметр, характеризующий степень биологической доступности препарата Рифабутин в липосомальной форме,  $AUC_{0-48}$ , увеличивается с уве-

личением дозы линейно (рис. 2) и имеет статистически значимые различия в зависимости от вводимой дозы.

Для проверки гипотезы линейности был проведен регрессионный анализ, в результате которого было установлено, что уравнение линейной регрессии является значимым ( $P=0,0047$ ), свободный член уравнения незначимо отличается от нуля: абсолютное значение критерия  $t$  составило 0,91 при критическом значении двустороннего  $t$ -критерия Стьюдента 4,30. Полученные результаты позволяют принять гипотезу линейности для изучаемых доз препарата Рифабутин в липосомальной форме.

Значения максимальной концентрации  $C_{max}$  также имеют статистически значимые отличия в зависимости от дозы. Среднее время удержания препарата (MRT) период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) и показатель  $C_{max}/AUC_t$  не имеют значимых отличий при изменении дозы препарата.

С целью оценки относительной биодоступности субстанции рифабутина и его липосомальной формы сравнивали значения максимальной концентрации ( $C_{max}$ ), времени её достижения ( $T_{max}$ ), площади под фармакокинетической кривой ( $AUC_{0-48}$ ), полученные при введении изучаемых объектов в дозе 13 мг/кг.

Основной параметр, характеризующий степень биологической доступности препарата,  $AUC_{0-48}$ , а также максимальная концентрация  $C_{max}$  имеют статисти-

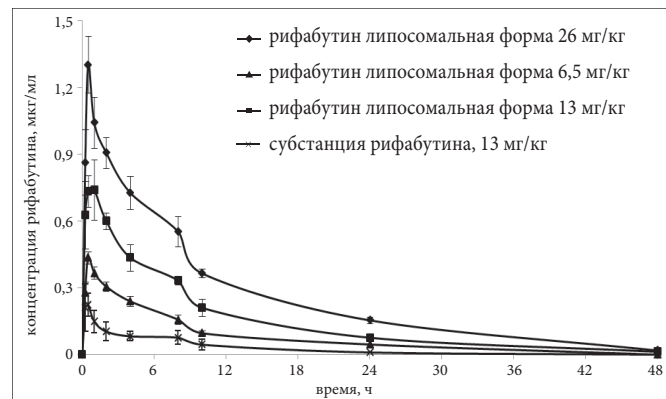


Рис. 1. Кривая «концентрация-время» рифабутина при однократном эндотрахеальном введении исследуемого препарата в различных дозировках и субстанции рифабутина ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm S_x$ )

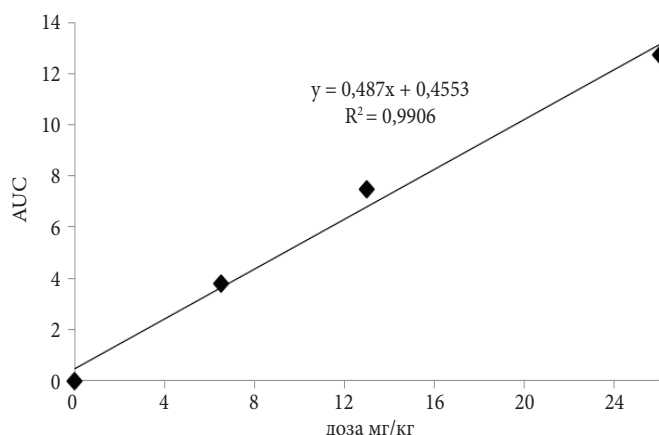


Рис. 2. Зависимость значений  $AUC_{0-48}$  от величин вводимых доз препарата Рифабутин в липосомальной форме

Таблица 2

Показатели фармакокинетики рифабутина при однократном эндотрахеальном введении препарата Рифабутин в липосомальной форме (ООО «Технология лекарств», Россия) и его субстанции  $\bar{x} \pm S_x$

Объект	$C_{max}$ , мкг/мл	$AUC_{0-48}$ , ч·мкг/мл	MRT, ч	$C_{max}/AUC_t$ , ч	$T_{1/2}$ , ч	$T_{max}$ , ч
Рифабутин липосомальный 6,5 мг/кг	$0,44 \pm 0,03$	$3,78 \pm 0,27$	$9,42 \pm 0,98$	$0,12 \pm 0,01$	$6,53 \pm 0,67$	$0,60 \pm 0,10$
Рифабутин липосомальный 13 мг/кг	$0,92 \pm 0,09$	$7,46 \pm 0,31$	$9,88 \pm 0,97$	$0,13 \pm 0,02$	$6,85 \pm 0,68$	$0,55 \pm 0,12$
Рифабутин липосомальный 26 мг/кг	$1,30 \pm 0,13$	$12,74 \pm 0,94$	$10,69 \pm 0,19$	$0,10 \pm 0,01$	$7,41 \pm 0,13$	$0,50 \pm 0,10$
Рифабутин субстанция 13 мг/кг	$0,25 \pm 0,08$	$1,43 \pm 0,48$	$8,34 \pm 0,63$	$0,17 \pm 0,01$	$5,78 \pm 0,43$	$0,42 \pm 0,08$

чески значимые отличия в зависимости от вводимого объекта: максимальная концентрация рифабутина после введения липосомальной формы в 3,7 раза выше, чем после введения субстанции, значения площади под фармакокинетической кривой выше в 5,2 раза.

Время достижения максимальной концентрации несколько выше после введения липосомальной формы, однако, статистически значимых различий установлено не было. Остальные параметры ( $MRT$ ,  $T_{1/2}$ ,  $C_{max}/AUC$ ) также не имеют значимых отличий.

Относительная биологическая доступность рифабутин в липосомальной форме, рассчитанная как отношение площадей под фармакокинетической кривой «концентрация-время» для липосомальной формы и субстанции составила 522%. Полученные данные свидетельствуют о значимом увеличении биологической доступности рифабутин при эндотрахеальном введении его в липосомальной форме по сравнению с субстанцией.

Для липосомальной формы рифабутин было изучено накопление действующего вещества в ткани легких, а также распределение в тканях печени и сальника (рис. 3).

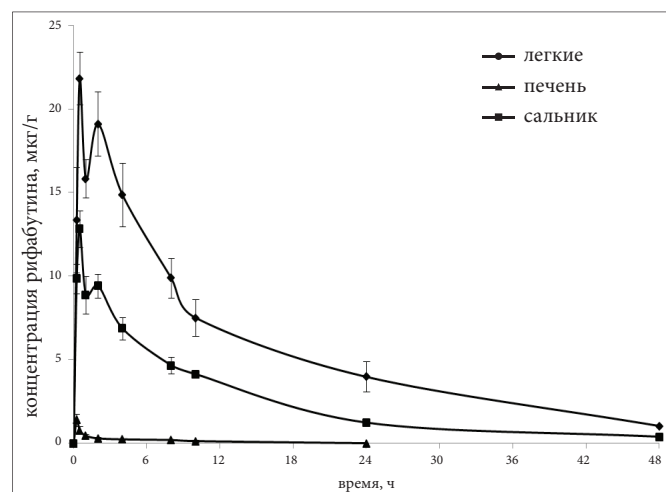


Рис. 3. Кривые «концентрация-время» рифабутин при однократном эндотрахеальном введении исследуемого препарата Рифабутин в липосомальной форме в различных органах ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm S_x$ )

В исследуемых тканях рифабутин определяется уже через 15 минут после введения, максимум концентрации достигается через 30 минут. Минимальное количество действующего вещества ( $C_{min}$  около 1,4 мкг/г) наблюдается в сальнике — наименее васкуляризированной ткани. Для лёгочной ткани и ткани печени максимальная концентрация составила 21,8 и 12,8 мг/г, соответственно. Через 2 часа после введения липосомальной формы рифабутин в печени и лёгких наблюдается второй, менее выраженный, подъем concentra-

ции рифабутин.

Интенсивность проникновения фармакологического средства в периферические ткани была охарактеризована тканевой доступностью ( $f_t$ ), определяемой как отношение значения  $AUC$  в ткани ( $AUC_t$ ) к соответствующей величине  $AUC$  в плазме, а также значением периода полувыведения и среднего времени удержания ( $T_{1/2}$  и  $MRT$ ). Рассчитанные параметры приведены в табл. 3.

Таблица 3

Основные показатели проникновения рифабутин в сальник при однократном эндотрахеальном введении препарата Рифабутин в липосомальной форме ( $\bar{x} \pm S_x$ )

Орган	$AUC_{0-48}$ , мкгЧ	$MRT$ , ч	$T_{1/2}$ , ч	$f_t$
лёгкие	$274,34 \pm 28,76$	$12,51 \pm 0,60$	$8,67 \pm 0,41$	36,77
печень	$123,80 \pm 4,65$	$10,84 \pm 0,51$	$7,51 \pm 0,35$	16,59
сальник	$3,72 \pm 0,92$	$4,36 \pm 0,82$	$3,02 \pm 0,57$	0,50

Рифабутин в липосомальной форме интенсивно распределяется в ткани исследованных органов. Схожие результаты были получены при изучении распределения в тканях рифабутин на мышцах после внутривенного введения липосомальной формы рифабутин [2]: в исследовании было установлено интенсивное распределение действующего вещества в ткани лёгких, селезёнки и печени. В проведённом исследовании концентрации рифабутин в сильно васкуляризированных органах значительно выше, чем в слабо васкуляризированных органах. В легочной ткани концентрации рифабутин значительно более высокие по сравнению с плазмой крови (площадь под фармакокинетической кривой в плазме в 36 раз меньше, чем в легких), среднее время удержания также наиболее высокое в легких.

Проведённое на крысах исследование фармакокинетики липосомальной лекарственной формы рифабутин показало, что после однократного введения препарата на трёх уровнях доз фармакокинетика препарата Рифабутин в липосомальной форме является линейной в диапазоне доз 6,5—26 мг/кг, действующее вещество интенсивно распределяется в сильно васкуляризированные органы, содержание его в слабо васкуляризированных органах значительно ниже.

Таким образом, включение рифабутин в липосомы является перспективной терапевтической системой для лечения или профилактики инфекционных заболеваний. Эндотрахеальное введение липосомального рифабутин крысам привело к повышению концентрации действующего вещества в месте введения (лёгких) по сравнению с введением чистого рифабутин, при этом относительная биодоступность рифабутин в липосомальной форме составила 522%.

## Литература

1. *Gaspar M.M., Neves S., Portaels F., Pedrosa J., Silva T.M., Cruz M.E.* Therapeutic efficacy of liposomal rifabutin in a *Mycobacterium avium* model of infection. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. Vol. 44, № 3. P. 292—306.
2. *Gaspar M.M., Cruz A., Penha A.F., Reymão J., Sousa A.C., Eleuterio C.V., et al.* Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis. // *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2008. Vol.31, P. 37—45.
3. *Kulkarni P.R., Yadav J.D., Vaidya K.A.* Liposomes: a novel drug delivery system. // *International J. of current pharmaceutical research.* 2011. Vol.3, №.2. P. 10-18.
4. *Исмаилова Г.К., Жилченко Е.Б., Ефременко Д.В., Головченко Т.В., Малецкая О.В., Одинец А.В., Кремнева Г.М., Романова Л.В.* Эффективность применения липосомальных форм антибиотиков при лечении некоторых инфекционных заболеваний в эксперименте. // *Вестник ВолГМУ.* 2007. Т. 21, №1. С. 64-67.
5. *Пиотровский В.К.* Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики. // *Фармакология и токсикология.* 1986. Т. 49, №5. С.118-127.
6. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011.
7. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1994, pp. 1—5.
8. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1996, pp. 1—8.
9. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. — Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001.